

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

⑫ 公表特許公報(A)

平4-507199

⑬ 公表 平成4年(1992)12月17日

⑭ Int. Cl. 5

識別記号

庁内整理番号

審査請求 未請求

予備審査請求 未請求

部門(区分) 1(1)

C 12 Q 1/18  
C 12 M 1/34  
3/00

6807-4B  
7229-4B  
2104-4B

(全 14 頁)

⑮ 発明の名称 腫瘍細胞に対する細胞毒性アッセイの実施のための方法及び装置

⑯ 特 願 平3-509393

⑰ 出 願 平3(1991)5月2日

⑱ 翻訳文提出日 平4(1992)1月7日

⑲ 国際出願 PCT/US91/03010

⑳ 国際公開番号 WO91/17240

㉑ 国際公開日 平3(1991)11月14日

優先権主張 ㉒ 1990年5月7日 ㉓ 米国(US) ㉔ 520,311

㉕ 発 明 者 イエン・マガイア, ユー, ビン アメリカ合衆国98008、ワシントン、ベルビュー、ノースイースト、ウェストレイクサマミツシュパークウェイ 500

㉖ 出 願 人 バクスター、ダイアグノステイ アメリカ合衆国60015、イリノイ、デヤフィールド、バクスターツクス、インコーポレイテッド パークウェイ 1

㉗ 代 理 人 弁理士 赤岡 迪夫

㉘ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CA, CH(広域特許), DE(広域特許), DK(広域特許), ES(広域特許), FR(広域特許), GB(広域特許), GR(広域特許), IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), SE(広域特許)

最終頁に続く

請求の範囲

1. 化学療法剤に対する感受性を求めるために生検腫瘍細胞をアッセイするためのキットであって、

(イ) 前記生検腫瘍細胞を受けるための、そして少なくとも1種の化学療法剤の予め決定された量を含むマルチコンパートメント容器と、

(ロ) 前記マルチコンパートメント容器中での前記腫瘍細胞の生育を支持するに十分な量の培地と、

(ハ) 細胞の増殖又は細胞の生存性の指標と、そして

(ニ) 前記化学療法剤に対する前記生検腫瘍細胞の感受性の測定としての細胞生育又は増殖の阻害のパーセントを決定する手段とからなるキット。

2. 前記マルチコンパートメント容器が腫瘍細胞の生育を効率化するために生育マトリクスを含むものであることを特徴とする、請求項1に記載のキット。

3. 前記マルチコンパートメント容器がマイクロウェルプレートであることを特徴とする、請求項1に記載のキット。

4. 前記指標が放射性、酵素性、色素原性、リン光性、化学発光性又は蛍光性指標よりなる群より選ばれたものであることを特徴とする、請求項1に記載のキット。

5. 前記指標がトリチウム標識チミジンであることを特徴とする、請求項4に記載のキット。

6. 化学療法剤に対する感受性を求めるために生検腫瘍細胞をアッセイするためのキットであって、

(イ) 前記生検腫瘍細胞を受けるための第1のマルチコンパートメント容器と、

(ロ) 乾燥形態の少なくとも1種の化学療法剤の予め決定された量を受けるための、第2のマルチコンパートメント容器と、

(ハ) 前記第1のマルチコンパートメント容器中での前記腫瘍細胞の生育を支持するに十分な量の培地と、

(ニ) 前記乾燥した化学療法剤を生理学的に達成し得る投与量範囲に再構成するに十分な量の培地と、

(ホ) 細胞の増殖又は細胞の生存性の指標と、そして

(ヘ) 前記化学療法剤に対する前記生検腫瘍細胞の感受性の測定としての細胞生育又は増殖の阻害のパーセントを決定する手段とからなるキット。

7. 前記第1のマルチコンパートメント容器が腫瘍細胞の生育を効率化するために生育マトリクスを含むものであることを特徴とする、請求項6に記載のキット。

8. 前記第1のマルチコンパートメント容器及び第2のコンパートメント容器がマイクロウェルプレートであることを特徴とする、請求項6に記載のキット。

9. 前記化学療法剤の予め決定された量が前記第2の容器にマイクロウェル薬物条片として加えられるものである、請求項6に記載のキット。

10. 前記指標が放射性、酵素性又は蛍光性指標よりなるグループより選ばれたものであることを特徴とする、請求項6に記載のキット。

11. 前記指標がトリチウム標識チミジンであることを特徴とする

る、請求項10に記載のキット。

12. 化学療法剤に対する生検腫瘍細胞の感受性をアッセイするための方法であって、

(イ) マルチコンパートメント容器中で、細胞懸濁液を形成するに充分な量の生育培地及び予め決定された量の化学療法剤とともに腫瘍細胞をインキュベートし、

(ロ) 一定のコンパートメントに腫瘍細胞の生育又は生存性の指標を加え、

(ハ) 前記指標の量を測定し、そして

(ニ) 前記化学療法剤が加えられた前記コンパートメント中の前記指標の量を前記化学療法剤が加えられなかったコンパートメントと比較して、前記化学療法剤に対する前記腫瘍細胞の感受性を決定することよりなる方法。

13. 前記生育培地が前記腫瘍細胞の生育及び増殖を選択的に高めるために最少限の血清及びカルシウム含量を以て構成されているものであることを特徴とする、請求項12に記載の方法。

14. 前記マルチコンパートメント容器がマイクロウェルプレートであることを特徴とする、請求項12に記載の方法。

15. 前記容器が生育マトリクスで被覆されていることを特徴とする、請求項12に記載の方法。

16. 前記マトリクスが牛角膜内皮細胞より誘導されたものであることを特徴とする、請求項15に記載の方法。

17. 前記指標が放射性、酵素性又は蛍光性指標よりなる群より選ばれるものであることを特徴とする、請求項12に記載の方法。

るものであることを特徴とする、請求項19に記載の方法。

21. 前記第1のマルチコンパートメント容器がマイクロウェルプレートであることを特徴とする、請求項19に記載の方法。

22. 予め決定された量の前記化学療法剤がマイクロウェル薬物条片として前記第2の容器に加えられるものであることを特徴とする、請求項19に記載の方法。

23. 前記容器が生育マトリクスで被覆されたものであることを特徴とする、請求項19に記載の方法。

24. 前記マトリクスが牛角膜内皮細胞より誘導されたものであることを特徴とする、請求項23に記載の方法。

25. 前記指標が放射性、酵素性又は蛍光性指標よりなる群より選ばれるものであることを特徴とする、請求項19に記載の方法。

26. 前記指標がトリチウム標識チミジンであることを特徴とする、請求項25に記載の方法。

27. 化学療法剤に対する生検腫瘍細胞の感受性をアッセイするための方法であって、

(イ) 細胞懸濁液を形成するに充分な量の生育培地とともに前記腫瘍細胞をインキュベートし、

(ロ) 前記細胞懸濁液を第1のマルチコンパートメント容器に加え、

(ハ) 乾燥形態の少なくとも1の化学療法剤の予め決定された量を第2のマルチコンパートメント容器に加え、

(ニ) 前記乾燥した化学療法剤を生理学的に到達できる投与量範囲内に再構成するに充分な量の前記培地を加え、

18. 前記指標がトリチウム標識チミジンであることを特徴とする、請求項17に記載の方法。

19. 化学療法剤に対する生検腫瘍細胞の感受性をアッセイするための方法であって、

(イ) 細胞懸濁液を形成するに充分な量の生育培地とともに前記腫瘍細胞をインキュベートし、

(ロ) 前記細胞懸濁液を、生育マトリクスで被覆した第1のマルチコンパートメント容器に加え、

(ハ) 乾燥形態の少なくとも1の化学療法剤の予め決定された量を第2のマルチコンパートメント容器に加え、

(ニ) 前記乾燥した化学療法剤を生理学的に到達し得る投与量範囲内に再構成するに充分な量の前記培地を加え、

(ホ) 前記再構成された化学療法剤を腫瘍細胞を含む前記第1の容器の一定のコンパートメントに加え、

(ヘ) 前記化学療法剤が前記腫瘍細胞に影響を与えるに充分な時間前記第1の容器中で前記化学療法剤をインキュベートし、

(ト) 前記第1のマルチコンパートメント容器に腫瘍細胞の生育又は生存性の指標を加え、

(チ) 前記指標の量を測定し、そして

(リ) 前記化学療法剤が加えられた前記コンパートメント中の前記指標の量を前記化学療法剤が加えられなかったコンパートメント中の指標の量と比較して、前記化学療法剤に対する前記腫瘍細胞の感受性を決定することよりなる方法。

20. 前記生育培地が、前記腫瘍細胞の生育及び増殖を選択的に高めるために最少限の血清及びカルシウム濃度を以て構成されてい

(ホ) 前記再構成された化学療法剤を腫瘍細胞を含む前記第1の容器の一定のコンパートメントに加え、

(ヘ) 前記第1の容器中で前記化学療法剤を、前記化学療法剤が前記腫瘍細胞に影響を与えるに充分な時間インキュベートし、

(ト) 前記第1のマルチコンパートメント容器に腫瘍細胞の生育又は生存性の指標を加え、

(チ) 前記指標の量を測定し、そして

(リ) 前記化学療法剤が加えられた前記コンパートメント中の前記指標の量を前記化学療法剤が加えられなかったコンパートメント中の前記指標の量と比較して、前記化学療法剤に対する前記腫瘍細胞の感受性を決定することよりなる方法。

28. 前記生育培地が、前記腫瘍細胞の生育及び増殖を選択的に高めるために最少限の血清及びカルシウム含量を以て構成されるものであることを特徴とする、請求項27に記載の方法。

29. 前記第1のマルチコンパートメント容器がマイクロウェルプレートであることを特徴とする、請求項27に記載の方法。

30. 予め決定された量の前記化学療法剤がマイクロウェル薬物条片として前記第2の容器に加えられるものであることを特徴とする、請求項27に記載の方法。

31. 前記容器が生育マトリクスで被覆されたものであることを特徴とする、請求項27に記載の方法。

32. 前記マトリクスが牛角膜内皮細胞より誘導されたものであることを特徴とする、請求項31に記載の方法。

33. 前記指標が放射性、酵素性又は蛍光性の指標よりなる群より選ばれることを特徴とする、請求項27に記載の方法。

3.4. 前記指標がトリチウム標識チミジン することを特徴とする、請求項33に記載の方法。

腫瘍細胞に対する細胞毒性アッセイの実施のための方法及び装置

#### 発明の背景

#### 発明の分野

本発明は、ヒトの生検腫瘍細胞に対する細胞毒性アッセイの実施のための方法及び装置に関する。

#### 先行技術の記述

1955年、Karnofsky は協賛的聴衆に対して、アルキル化剤及び抗代謝剤が、限られた数のヒト腫瘍に対していくらかの化学療法的活性を示す能力を有することを発表した。腫瘍の化学療法は、その時以来大きく進歩し、多くの腫瘍の治療において重要な役割を維持している。現在では、化学療法は、血液学的新生物；肉腫；睾丸の、妊娠の、栄養胚葉の、及びウィルムス腫瘍；及び小細胞性の肺癌及び卵巣癌を含む16種を超える腫瘍タイプを治療することができる。補助的位置において治療可能性のある他の腫瘍は、乳癌及び結腸癌である。化学療法における進歩は続いており、より有効な薬物、より毒性が低い薬物類似体、及び組織への取込みが改善され及び血漿中での半減期のより長い薬物が開発されている。DeVita V.T. Jr., Cancer Principles and Practice of Oncology, Principles of Chemotherapy (V.T. DeVita, Jr., S. Hellman, S.A. Rosenberg 編), J.B. Lippincott Co., Philadelphia, PA, 1989.

現在、腫瘍の化学療法的治療は経験的薬物選択又は設定されたプロトコールの結果として得られた標準的プラクティスに基づく。

Von Hoff, D.D., L. Weisenthal, In Vitro Methods to Predict for Patient Response to Chemotherapy, Advances in Pharmacology and Chemotherapy, 17:133-156, 1980. Woltering, Eugene A., Administration of Cytotoxic Chemotherapeutic Agents Without Predictive Information, Laboratory of Medicine, 21:82, 1990.

標準的療法に対する患者の応答における差異は、しばしば、個々の患者の異なる腫瘍タイプの間及び同じ腫瘍タイプ内での双方のヒト腫瘍の高度な不均質性の結果である。この不均質性は、悪性細胞の化学的感受性に反映される。応答に於ける差異は、腫瘍に対する療法の効果を最大にし且つ患者のために副作用を防止するという化学療法の主要な目標を達成不可能にし得る。化学療法は生存への最善の可能性を提供することができるが、患者への毒性、免疫系の抑制、効果のない治療法による時間の損失、及び薬物耐性の発現等の、破壊的であり得る副作用をも有する。

予測的アッセイは、副作用が潜在的に生命を脅かすものであるような無効の薬物をそれが特定するものであることから、癌の化学療法においては特に重要である。化学療法剤に対する個人の腫瘍細胞の応答を予測することのできるin vitroアッセイの開発は、癌研究の長らくの目的の一つであった。この分野の先駆者達には次の者がふくまれる。Hanburger, Q.W., and S.E. Salmon, Primary Bioassay of Human Tumor Stem Cells, Science, 197:461-463, 1977, Hanburger, Anne W., The Human Tumor Clonogenic Assay as a Model System in Cell Biology, International Journal of Cell Cloning, 5:89-107, 1987, Scheithauer, W., G.M. Clark, S.E. Salmon, W. Dorda, R.H.V. Shoemaker, D.D. Von Hoff, Model for Estima-

tion of Clinically Achievable Plasma Concentrations for Investigational Anticancer Drug in man, Cancer Treatment Reports, 70:1379, Shoemaker, R.H., M.K. Wolpert-DeFilippes, R.W. Makuch, Application of the Human Tumor Clonogenic Assay for New Drug Screening, Stem Cells, 1:308, 1981, Shoemaker, R.H., M.K. Wolpert-DeFilippes, R.W. Makuch, Use of the Human Tumor Clonogenic Assay for New Drug Screening, Proc. Amer. Assoc. Cancer Research, 24:1231, 1983, Shoemaker, R.H., M.K. Wolpert-DeFilippes, J.M. Venditti, IV., Human Tumors in the Screening of Cytostatics, Behring Inst. Mitt., 74: 262, 1984, Alberts, D.S., H.S.G. Chen, Cloning of Human Tumor Cells, (S.E. Salmon 編), 351-359, Alan R. Liss, Inc., New York, NY, 1980, Alberts, D.S., H.S.G. Chen, L. Young, T.E. Moon, S.A. Loesch, E.A. Surwit, S.E. Salmon, Improved Survival for Relapsing Ovarian Cancer (OVCA) Patients Using the Human Tumor Stem Cell Assay (HTSCA) to Select Chemotherapy, Proc. Am. Assoc. Cancer Research, 22:461, 1981, Alberts, D.S., S.E. Salmon, E.A. Surwit, H.S.G. Chen, T.E. Moon, L. Young, Combination Chemotherapy (CRx) In Vitro With the Human Tumor Stem Cell Assay (HTSCA), Cancer Chemother. Pharmacol., 6:253, 1981, Von Hoff, Daniel D., James Casper, Edward Bradley, John Sandbach, Donna Jones, Robert Makuch, Association Between Human Tumor Colony-Forming Assay Results and Response of an Individual Patient's Tumor to Chemotherapy, American Journal of Medicine, 70:1027-1032, 1981., Von Hoff, Daniel D., Gary M. Clark, Brian

J. Stogdill, Michael F. Sarosdy, Michael T. O'Brien, James T. Casper, Douglas E. Mattox, Carey P. Page, Anatolio B. Cruz, and John F. Sandbach, Prospective Clinical Trial of a Human Tumor Cloning System, Cancer Research, 43:1926-1931, 1983.

Hanauske, Axel-R., Daniel D. Von Hoff, Clinical Correlations with the Human Tumor Cloning Assay, Cancer Investigation, 3(6):541-551, 1985., Von Hoff, Daniel D., In Vitro Predictive Testing: The Sulfonamide Era, International Journal of Cell Cloning, 5:179-190, 1987, Von Hoff, Daniel D., Commentary, He's Not Going to Talk About In Vitro Predictive Assay Again, Is He?, Journal of the National Cancer Institute, 82:96-101, 1990.

現行の in vitro 化学感受性方法は、2層の柔らかい寒天におけるヒト腫瘍のクローニングすなわちヒト腫瘍クローニングアッセイ (HTCA)、腎下カプセルアッセイ法、蛍光細胞プリントアッセイ (Rotmann RIVCA) 及びトリチウム標識チミジン取込みアッセイ等を含む。

Salmon及びHamburgerによって開発された、半固形寒天中でヒト腫瘍細胞を増殖させる伝統的なin vitro法は、ヒト腫瘍クローニングアッセイ (HTCA) と呼ばれる。この方法においては、患者からの固形の腫瘍又は悪性の体液を腫瘍細胞源として使用することができる。腫瘍標本は、単一細胞懸濁液の要求を満たすために機械的に又は酵素的にばらばらにされる。短期の薬物治療を予測するとき、治療薬物を含む又は含まない培地中で単一細胞懸濁液をインキュベートする。細胞を薬物に1時間曝した後、対象及び処理細胞を

Rotmanと共同研究者らは、蛍光細胞プリントアッセイ (FCA) とも呼ばれるin vitroの化学的感受性法 (RIVCA) を開発した。このアッセイにおいては、腫瘍断片は薬物に曝されそして培養される。腫瘍細胞の生存性は、それらのフルオレッセインジアセテートを加水分解しそしてフルオレッセインを保持する能力によって測定される。薬物処理の前後での蛍光性断片の数における差が、薬物応答の測定として使用される。50乃至100個の細胞より大きな凝集物のみが写真により記録されることから、RIVCAは、液体標本や小さい細胞凝集物を生ずる固体標本には適さない。RIVCAによる薬物耐性の予測可能性はHTCAに類似であるが、RIVCAを用いると、in vitroで一層多くの数の腫瘍が増殖でき評価できる。Woltering, Eugene A., Tumor Chemosensitivity Testing: An Evolving Technique, Laboratory Medicine, 2:82-84, 1990

HTCAにおける固形腫瘍から単一細胞懸濁液を得ることの困難、長いインキュベーション時間及び乏しい腫瘍増殖のため、代替方法が評価されてきている。これらの方法の一つは、細胞の生存性及び増殖の指標として、DNA合成の間のトリチウム標識チミジンのような放射性核種の取込みを用いる。腫瘍標本は短時間又は連続的に薬物に曝され、そして液体培地中で培養される。トリチウム標識チミジンが添加され、培養物は16乃至24時間インキュベートされる。取り込まれた放射性核種は収獲され、シンチレーションカウンターでカウントされる。癌化学療法剤に曝された腫瘍細胞によるトリチウム標識チミジンの取込みの減少は、その薬物に対するその腫瘍細胞の感受性を示す。このアッセイは、HTCA、SRA及び

寒天上に播種する。逆、薬物治療のためには、2層系において細胞を含む上側寒天層に薬物を直接に加える。いずれの場合にも、細胞は14乃至21日間インキュベートされ、コロニー形成が観察される。薬物処理された細胞を含むプレートと対照プレートとでカウントされたコロニー数の差が、薬物に対する応答性を決定するのに用いられる。Shoemaker, Robert H., Mary K. Wolpert-DeFilippes, David H. Kern, Michael M. Lieber, Robert W. Makuch, Jeanette R. Melnick, William T. Miller, Sydney E. Salmon, Richard M. Simon, John M. Venditti and Daniel D. Von Hoff, Application of a Human Tumor Colony Forming Assay to a New Drug Sensitivity, Cancer Research, 45:2145-2153, 1985, Woltering, Eugene A., Tumor Chemosensitivity Testing: An Evolving Technique, Laboratory Medicine, 2:82-84, 1990.

腎下カプセルアッセイ法は、単一細胞懸濁液ではなく腫瘍断片を利用して複数の腫瘍細胞集団の応答性を測定することにより、伝統的HTCAと異なる。腎下カプセルは、ヒト腫瘍標本を無胸腺マウスへの第1世代移植外来性移植片として利用する、in vitroアッセイである。腎下カプセルアッセイでの薬物耐性の予測可能性がHTCAに優るものであることは見出されていない。最大の利点は腎下カプセルを用いるとHTCAよりも多くの腫瘍標本がうまく増殖できることである。Woltering, Eugene A., Tumor Chemosensitivity Testing: An Evolving Technique, Laboratory Medicine, 2:82-84, 1990. しかしながら、マウスコロニーの維持に伴う費用及び必要とする技術的熟練のため、腎下カプセルアッセイは日常的な試験とはなっていない。

RIVCAに対していくつかの利点を持っている。すなわち、要する培養期間 (4乃至6日) が短く、より小さいサイズのサンプルをアッセイでき、厳格な単一細胞懸濁液の必要性 (固形腫瘍ではしばしば達成不能の目標である) が除かれる。このアッセイの別の利点は、組織培養技術によるコロニーの主観的計数とは対照的に、腫瘍増殖の判定が定量的且つ自動的であることである。in vitro化学感受性アッセイにおける放射性核種検出システムの妥当性は実証されてきた。Kern, David H., Carol R. Drogemüller, Michael C. Kennedy, Susanne U. Hildebrand-Zanki, Nobuhiko Tanigawa, and Vernon K. Sondak, Development of a Miniaturized, Improved Nucleic Acid Precursor Incorporation Assay for Chemosensitivity Testing of Human Solid Tumors, Cancer Research, 45:5435-5441, 1985; Daidone, Maria Grazia, Rosella Silvestrini, Ornella Sanfilippo, Nadia Zaffaroni, Marco Varini, Mario DeLena, Reliability of an In Vitro Short-Term Assay to Predict the Drug Sensitivity of Human Breast Cancer, Cancer, 56:450-456, 1985; Tanigawa, Nobuhiko, David H. Kern, Yorinori Hikasa, and Donald L. Morton, Rapid Assay for Evaluating the Chemosensitivity of human Tumors in Soft Agar Culture, Cancer Research, 42:2159-2164, 1982; Wilson, A.P., C.H.J. Ford, C.E. Newman, A. Howell, A Comparison of Three Assays Used for the In Vitro Chemosensitivity Testing of Human Tumours, British Journal of Cancer, 49:57-63, 1984. 種々の固形腫瘍タイプ (乳癌、肺癌、卵巣癌、色素細胞腫、肉腫) からの細胞をアッセイしているあるグループの研究者達は、耐性の予測においては80% (280/35

1) の標本が100%の正確さをもって、その感受性の予測においては50%の正確さをもって評価できることを見出した。Kern, David H., Carol R. Drogenmuller, Michael C. Kennedy, Susanne U. Hildebrand-Zanki, Nobuhiko Tanigawa, and Vernon K. Sondak, Development of a Miniaturized, Improved Nucleic Acid Precursor Incorporation Assay for Chemosensitivity Testing of Human Solid Tumors, Cancer Research, 45:54535-5441, 1985. 他の報告においては、乳癌からの細胞のみのアッセイを行い、腫瘍の感受性と耐性の予測はそれぞれ75%及び81%の正確さであった。Dai done, Maria Grazia, Rosella Silvestrini, Ornella Sanfilippo, Nadia Zaffaroni, Marco Varini, Mario DeLena, Reliability of an In Vitro Short-Term Assay to Predict the Drug Sensitivity of Human Breast Cancer, Cancer, 56:450-456.

腫瘍感受性アッセイを実施するためには、腫瘍は培養で維持されなければならない。上皮細胞は、この分野において選り抜きの培養培地である。最近発表された報告、Von Hoff, Daniel D., Commentary, He's Not Going to Talk About In Vitro Predictive Assays Again, Is He?, Journal of the National Cancer Institute, 82:96-101, 1990. において、ほとんど14,000の腫瘍サンプルに基づき、たった3,886 すなわち27.9%のみに、薬物感受性の評価のための十分な in vitro の生育が見られた。最近の培養条件の改良と敏感な検出方法の開発は、評価しうる標本を得る能力を高めた。Hanuske, Axel-R., Daniel D. Von Hoff, Clinical Correlations with the Human Tumor Cloning Assay, Cancer Investigation, 3(6):541-551, 1985, Shoemaker, Robert H., Mary K. Wolpert-DeFilip

Is in Serum-Free Medium, Analytical Biochemistry, 102:255-270, 1980. 従って、低いカルシウム及び血清濃度を含み定義された成長因子とホルモンとを補強された生育培地は、上皮性腫瘍細胞の優先的生育を許容し、評価し得る標本数を増大させる。Reid, Lola M., Generic Method for Defined Hormonal and Matrix Conditions for Studies of Growth or Gene Expression in Differentiated Epithelia, Methods in Molecular Biology, (J.W. Pollard, J. M. Walker 編), Volume 5: Tissue Culture, Crickard, Kent, Ulla Crickard, Mahmood Yoonessi, Human Ovarian Carcinoma Cells Maintained on Extracellular Matrix Versus Plastic, Cancer Research, 43:2762-2767, 1983.

Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) (Life Technologies, Grand Island, NY) は、無機要素、エネルギー源、ビタミン、アミノ酸及び低濃度のカルシウム (0.67 mM) を含有する基本培地である。RPMI は、しかしながら、上皮性腫瘍細胞の増殖にしばしば必要なホルモンと成長因子とを欠いている。生育させる細胞タイプの要求に応じて、生育培地に種々のホルモン及び生育因子が、典型的には個々に加えられる。Barnes, David and Gordon Sato, Methods for Growth of Cultured Cells in Serum-Free Medium, Analytical Biochemistry, 102:255-270, 1980, Ham, R. G., Importance of the Basal Nutrient Medium in the Design of Hormonally Defined Media, Cold Spring Harbor Laboratory, 9:39-60, 1982.

2300名の患者の調査で、in vitro の化学感受性アッセイと実際の患者の応答との間の相関は、真の感受性の予測性は69%であり、

pes, David H. Kern, M. Lieber, Robert W. Makuch, Jeanette R. Melnick, William T. Miller, Sydney E. Salmon, Richard M. Simon, John M. Venditti, and Daniel D. Von Hoff, Application of a Human Tumor Colony Forming Assay to New Drug Sensitivity, Cancer Research, 45:2145-2153, 1985. 不十分な in vitro の腫瘍増殖という具体的問題は、広範囲に検討された。十分な腫瘍増殖を達成するためには、腫瘍細胞 (最も普通には上皮起源のものである) が、繊維芽細胞のような正常細胞の増殖を阻害しつつ活発に増殖するのを許容するよう、定義され選択された培地が必要である。しかしながら、「伝統的」な生育培地及び高い血清濃度は、上皮性腫瘍細胞の生育には最適ではないことが明らかとなった。Reid, Lola M., Generic Methods for Defined Hormonal and Matrix Conditions Studies of Growth of Gene Expression in Differentiated Epithelia, Methods in Molecular Biology, (J.W. Pollard, J.M. Walder 編), Volume 5: Tissue Culture. 高いカルシウム (1 mM より大) 及び高い血清 (10 乃至 25%) 濃度を含む生育培地は繊維芽細胞の増殖を促進する。これとは対照的に、上皮細胞は、低いカルシウム (約 0.4 mM) 及び低い血清 (1% 以下) の環境において最高の育成を示す。加えて、培地中の血清は、血清中の数種の決定的成分濃度のロット間変動のために、アッセイ間の一貫性のない結果に寄与する。培地中の低い血清濃度は、この変動の影響を減ずる。しかしながら、上皮性腫瘍細胞が血清中に存在する特有の成長因子とホルモンとを必要とすることから、血清濃度の減少はそれらの成長因子とホルモンとの補強を必要とする。Barnes, David and Gordon Sato, Methods for Growth of Cultured Cel

真の否定的予測性は91%であることを示した。Scheithauer, W., G.M. Clark, S.E. Salmon, W. Dorda, R.H. Shoemaker, D.D. Von Hoff, Model for Estimation of Clinically Achievable Plasma Concentrations for Investigational Anticancer Drugs in Man, Cancer Treatment Reports, 70:1379, Von Hoff, Daniel D., James Casper, Edward Bradley, John Sandbach, Donna Jones, Robert Makuch, Association Between Human Tumor Colony-Forming Assay Results and Response of an Individual Patient's Tumor to Chemotherapy, American Journal of Medicine, 70:1027-1032, 1981, Von Hoff, Daniel D., Gary M. Clark, Brian J. Stogdill, Michael P. Sarosdy, Michael T. O'Brien, James T. Casper, Douglas E. Mattox, Carey P. Page, Anatolio B. Cruz, and John F. Sandbach, Prospective Clinical Trial of a Human Tumor Cloning System, Cancer Research, 43:1926-1931, 1983, Hnauske, Axel-R., Daniel D. Von Hoff, Clinical Correlations With the Human Tumor Cloning Assay, Cancer Investigation, 3(6):541-551, 1985. これらの相関は、回顧的か又は予測的かいずれか一方の研究の結果である。予測的なランダム化された試験はたった2件が実施されたに過ぎない。一つの予測的研究は卵巣癌患者について実施され、応答率は、統計的には有意でなかったものの、標準の化学療法については65%及び、in vitro アッセイ結果に基づく治療では85%であった。Welander, C.E., T.M. Morgan, H.D. Homesley, Multiple Factors Predicting Responders to Combination Chemotherapy in Patients With Ovarian Cancer, In Human Tumor Cloning (S.E. Salmon, J.M. Trent 編) Orlando: Grune and Stratton, 521-

534, 1984. より大きな規模での予測的ランダム試験は、133例の進行した転移癌患者に関して実施された。患者の応答率は、in vitroアッセイ結果に基づく単一薬剤による化学療法を受けたものでは21%、そして臨床家の選択になる単一薬剤の投与を受けたものでは3%であった。Von Hoff, Daniel D., Commentary, He's Not Going to Talk About In Vitro Predictive Assays Again, Is He?, Journal of the National Cancer Institute, 82:96-101, 1990. これらの研究は、化学療法に応答する患者を予測するためのアッセイの一般的使用を支持する信頼できるデータを提供し始めている。

in vitroの化学応答性アッセイは、アッセイの臨床的利用性欠如に寄与する多くの障害のために、一般的に使用されるには至っていない。現在、in vitro薬物応答性アッセイは、大学病院や2、3の専門化されたサービスセンターで実施されている。これらの施設は一般的に標本の輸送を要求し、標本の処理が開始されるまでにしばしば24時間以上のロスを生じる。この24時間の間に標本の生存性は有意に低下する。加えてin vitroアッセイは、真に有効な抗癌剤がないことやin vivoの薬物動力学モデル作成の困難のために、一般的に使用されるには至っていない。in vitro化学応答性アッセイが一般的に使用されるに至らないこと他の理由には、アッセイの技術的複雑さ、in vitroで腫瘍細胞の生育ができないこと、長い回転時間、1回のアッセイを実施するに必要な腫瘍細胞数が多いこと、アッセイに適する標本の%が低いこと、及び薬物と培地の品質管理が欠如していること等が含まれる。

#### 発明の概要

の感受性の測定としての細胞の生育又は増殖の%を決定する手段、よりなるものである。

この場合、第1の容器はまた、標本の評価可能性を高めるために生育マトリクスで被覆されていてもよい。

本発明の目的の一つは、少ない数の腫瘍細胞を使用して治療薬剤に対する生検細胞の感受性をアッセイするための方法を提供することである。

本発明の目的の一つは、標本の評価可能性を高めるため及びアッセイの自動化を可能にするために、細胞外マトリクスで被覆した96穴のマイクロウェルを提供することである。細胞外マトリクスはin vivoの増殖性質と生物学的応答性を高める自然の層を提供するために使用される。

本発明の他の目的の一つは、上皮性腫瘍細胞の成長及び増殖を選択的に高めるために、最少限の血清及びカルシウム濃度を有する定義された生育培地を提供することである。本発明のまた別の目的の一つは、ホルモンと成長因子の補強によって上皮性腫瘍細胞の増殖を高めることである。

本発明の更なる別の目的の一つは、望ましい化学療法剤の選択を能率化するために、マイクロウェル薬物条片の形で化学療法剤を提供することである。

本発明の更なる別の目的の一つは、細胞の生存性測定の主観性を減ずるために腫瘍細胞の生存性の指標としてトリチウム標識チミジンの取込みを利用することである。トリチウム標識チミジンの取込みアッセイは、標本の試験期間を約3週間から5日に短縮する。

本発明の更なる別の目的の一つは、用意された薬物条片及び自動

本発明は、生検腫瘍細胞化学療法剤に対する感受性をアッセイする方法に関し、該方法は、細胞懸濁液を形成するため腫瘍細胞を充分な量の生育培地でインキュベートし、該細胞懸濁液を第1のマルチコンパートメント容器に加え、予め決定された量の少なくとも1の乾燥形態の化学療法剤を第2のマルチコンパートメント容器に加え、該乾燥した化学療法剤を生理学的に達成できる投与量領域内に再構成するために前記培地の十分量を加え、再構成された化学療法剤を腫瘍細胞を含んだ前記第1の容器の一定のコンパートメントに加え、該化学療法剤が該腫瘍細胞に影響を及ぼすに充分な時間前記容器をインキュベートし、該第1の容器に腫瘍細胞の生存性又は生育の指標を加え、該指標の量を測定し、そして前記化学療法剤の加えられた該コンパートメント中の該指標の量を、該化学療法剤を加えられなかったコンパートメント中の該指標量と比較し、該化学療法剤に対する該腫瘍細胞の感受性を決定することよりなる。前記第1の容器は、標本の評価可能性を高めるために生育マトリクスで被覆されていてもよい。

本発明はまた、化学療法剤に対する感受性を求めるため生検腫瘍細胞をアッセイするためのキットであって、(イ)該生検腫瘍細胞を受けるための第1のマルチコンパートメント容器、(ロ)予め決定された量の少なくとも1の乾燥形態の化学療法剤を受けるための第2のマルチコンパートメント容器、(ハ)前記第1のマルチコンパートメント容器中での前記腫瘍細胞の増殖を支持するに充分な量の培地、(ニ)前記乾燥した化学療法剤を生理学的に達成できる投与量範囲内に再構成するに充分な量の培地、(ホ)細胞の増殖又は生存の指標、及び(ヘ)前記化学療法剤に対する前記生検腫瘍細胞

化ができ特別の訓練を要しないものである放射性核種検出によって、技術的な複雑性を減ずることである。この減ぜられた技術的複雑性は、臨床研究室におけるin vitro予測アッセイの使用を可能にし、新鮮な標本の使用を許容する。新鮮な標本の使用が細胞の生存性を最大にすることを認識することは重要である。

#### 図面の簡単な説明

図1は化学応答性アッセイのフローチャートを示す。

図2はマイクロウェル薬物条片を示す。

図3はマイクロウェル薬物条片を有するプレート枠を示す。

図4はアドリマイシン(登録商標)に対する感受性のアッセイ結果を示す。

図5はブレオマイシン(登録商標)に対する感受性のアッセイ結果を示す。

図6は5-フルオロウラシル(登録商標)に対する感受性のアッセイ結果を示す。

図7はシスプラチノール(登録商標)に対する感受性のアッセイ結果を示す。

図8はメルファラン(登録商標)に対する感受性のアッセイ結果を示す。

#### 発明の詳細な説明

本キットは、標準の抗癌剤パネルに対する個々の癌患者の感受性の応答及び耐性を試験するために使用される。手術標本、悪性の体液、骨髄又は血液より得られるものを含む腫瘍標本は、組織培養プラスチック上で直接に又は修飾された表面を有する(フィブロンectin、コラーゲンその他の1若しくはより多くの細胞外マトリクス

又は種々の方法により修飾された表面電荷(被覆された)組織培養プラスチック上で回収のため培養される。乾燥した薬物は生育培地と再構成されて、細胞を含むウェルに移される。プレートは、薬物が細胞に対して効果を現すように更にインキュベートされる。薬物含有ウェル内でのまたは対照ウェル内(薬物を含まない)での細胞の生育が比較される。放射性核種の取込み、色素還元、又はタンパク質及び核酸の染色等を含む種々の方法を、増殖を評価するのに用いることができる。対照を100%として比較したときの薬物による生育阻害が、薬物に対する患者の応答の蓋然性の予測に用いられる。

このキットは、生育マトリクス層で被覆された又は被覆されていないマルチコンパートメント容器より構成される。該生育マトリクスは牛角膜内皮細胞により分泌されたものでも、又は再構成された基底膜タンパク質若しくは細胞の接着を促進する他のタンパク質、マトリクスでもよい。コンパートメントはまた、細胞の接着を促進するために電荷を加えることによって修飾することもできる。

マイクロタイターウェルの使用は、しかしながら、自動化を促進する。色素原染料、蛍光原染料を用いるアッセイ技術は、ELISAプレートリーダー又は蛍光リーダーによって読み取ることができる。加えて、細胞生育の指標として放射性核種標識した核酸又はタンパク質の取込みを用いる技術は、マイクロタイターウェルを使用することにより単純化することができる。取り込まれた放射性化合物は細胞収獲機で回収することができる。

化学療法剤は条片内にて乾燥することができる。図2を参照のこと。条片は類似のマイクロタイターウェルと類似の形状のハウジング

が含まれる。組織培養表面は、細胞接着を促進するためコロナ放電によって該表面を処理することにより修飾してもよい。代わりに、マトリクスを使用せず、薬物を組織培養プラスチック表面上に直接加えることもできる。

抗癌剤は、複製的に、予め決定された種々の濃度で、容器に配付されそして乾燥される。薬物はまた、種々のいかなるマトリクスで被覆された容器内でも乾燥することができる。術語「乾燥」は、凍結乾燥又は低温での乾燥を意味する。薬物は各条片内に、ELISAプレートに又は種々の形状の容器又は組織培養プラスチックに配付することができる。条片の形式は2つの目的のために採られる。すなわち、(1)使用者に試験すべき薬物の選択技を提供すること、(2)細胞を薬物でチャレンジする前の最初の操作の後に細胞が回復するのを許容すること。もし細胞が回復する必要があるならば、薬物再構成と移替えステップを割愛するために乾燥薬物を含んだ組織培養プレートを使用することができる。この場合には、細胞は直接に該薬物を含んだ組織培養プレート内に播種することができる。もし薬物が、細胞が培養される以外の容器にて乾燥されているならば、薬物を再構成し細胞が培養されるプレートに移替える必要がある。乾燥薬物条片は乾燥剤と共にアルミホイルパウチのような気密且つ遮光材料に包装され、密封される。

特殊な培地(1%牛胎仔血清を含有するRPMI培地)、成長因子及びホルモンを含む補強剤(Cyto-Gro(登録商標)289補強剤)及び腫瘍細胞の増殖を支持することのできる生育マトリクスがキットに含まれる。生育培地及び補助剤を加えた生育培地の種々は、DMEM、F12、McCoy's、CMRLのような、細胞生育に

内に嵌まる。図3を参照のこと。この形状は、マルチ流路ビベーターを用いての薬物移替えを能率化する。各種濃度に予め決定された化学療法剤は配付され、速やかに凍結されそして凍結乾燥される。乾燥薬物条片は乾燥剤と共にアルミホイルパウチ又は他の気密且つ遮光包装材料に包装され、そして密封される。この条片方式は使用者が望みの薬物を選択するのを許容する。

このキットの別の特徴は、ヒトの腫瘍の増殖を支持する培地及び補強剤にある。通常、薬物応答アッセイは、薬物の希釈、培地及びマトリクスの調製といった手間のかかるプロセスと結果を得るための労働集約的方法の故に、サービス研究室で行われる。加えて、試験に使用する試薬すなわち薬物、培地及び培地用補強剤のための品質管理を欠いている。このキットはこれらの技術的複雑さと問題点を単純化し、殆どの病院の臨床研究室での試験実施を可能にする。

マイクロタイターウェル条片は、96穴のマイクロタイタープレートのような第1のマルチコンパートメント容器に嵌め込まれる。96穴プレート以外のプレート、すなわち6、24、又は48穴のプレート又は他のいかなる形式の多穴プレートも使用することができる。これらのプレートは条片プレート又は通常の培養プレートの形をとる。

ウェルは生育マトリクス層により被覆してもしなくてもよい。

種々の生育マトリクス又は組織培養表面修飾には、種々の起源(すなわちラットの尾のコラーゲン、フィブロネクチン、正常胸腺機能のヌードマウス中で維持されたEHS移植可能腫瘍、正常又は腫瘍細胞株により分泌されたマトリクス等)の抽出基底膜タンパク質

適したいかなる強化緩衝培地であってもよい。生育補強剤は、Cyto-Gro(登録商標)289補強剤に含まれる又は含まれない、試験する細胞の増殖を促進する成長因子とホルモンとのいかなる組合せでもよい。

新鮮な腫瘍標本は、標準的な手法に従って集められそして輸送される。標本は機械的及び酵素的消化手順を用いて細胞懸濁液を得るよう加工され、そして生存性を評価するためにトリプシンを用いて分別計数される。ここに記述の手順においてアッセイを実施するには、少なくとも $3 \times 10^5$ 個の腫瘍細胞が存在しなければならないことに注意しなければならない。必要ならば、フィコール(Ficoll(登録商標))及びペルコール(Percoll(登録商標))密度勾配分離法の使用により腫瘍細胞を濃縮する。

処理後の細胞は、Roswell Park Memorial Institute(RPMI)1640培地、1%牛胎仔血清(FBS)、及びCyto-Gro(登録商標)289補強剤よりなる定義された生育培地中で懸濁され、分割されて細胞外マトリクス被覆96穴マイクロウェル組織培養プレートに加えられる。Cyto-Gro(登録商標)289補強剤は、上皮性腫瘍細胞の増殖を最大にするよう低血清性生育培地のためのホルモン及び成長因子補強剤を提供しそれにより各添加物を別々に在庫する必要をなくすことを目標として、Bartels Diagnosticsにより開発されたものである。Cyto-Gro(登録商標)289補強剤は、インスリン、トランスフェリン、セレン、B-エストラジオール、ヒドロコチゾン、プロスタグランジンF<sub>2α</sub>、及び上皮成長因子を含有する。RPMI、Cyto-Gro(登録商標)289補強剤及び低濃度の血清(1%)は、組み合わせられて、ヒト上皮性腫瘍細胞の生育のための選択的有



利性を有する生育培地を提供する。

上皮細胞の最大増殖はまた、原質又は細胞外マトリクスの存在にも依存する。細胞外マトリクスは種々のタイプのコラーゲン、グリコースアミノグリカン類、プロテオグリカン及び糖タンパク質より構成される。細胞外マトリクスの使用は、細胞の接着と生存を最大とし、さらに定義された培地中におけるホルモン及び成長因子の効果を最適にすることも見出されている。天然の及び再構成した多数の接着性細胞マトリクスが検討されてきた。天然に生産された層の使用はより生物学的に類似の生育マトリクスを提供し、各成分が天然の形態をとっていることを保証する。研究された再構成細胞外マトリクスはEngelbreth-Holm-Swarm マウス胚癌からの尿素抽出物であるMatrigel(登録商標)、及び塩類溶液、スクレアーゼ及び界面活性剤による胎盤組織抽出物であるBiomatrixを含む。牛角膜内皮細胞は細胞層の下に細胞外マトリクスを産生し、これは最も普通に使用される細胞外マトリクスである。研究は、細胞が牛角膜内皮細胞上で増殖すると凝集や塊を形成することなく細胞外マトリクス単層が形成されることを示している。細胞が凝集物として播かれた場合でさえも、細胞は拡がる。Vladavsky, I., G.M. Lui and D. Gospodarowicz, Morphological Appearance, Growth Behavior and Migratory Activity of Human Tumor Cells Maintained on Extracellular Matrix Versus Plastic, Cell 607-616, March 1980. 細胞単層の形成は、細胞外マトリクスにより促進され、トリチウム標識チミジン取込みアッセイの最適化を助ける。細胞外マトリクスの使用は、うまくin vitroで培養できる標本の数を高め、それぞれ85乃至89%対59乃至60%であることが示されている。前立腺癌

Charles III, Extracellular Matrix and Control of Proliferation of Vascular Endothelial Cells, Journal of Clinical Investigation, 65:1351-1364, 1980. 細胞単層の形成によるこれらの特徴すなわち、増大した評価可能性、トリチウム標識チミジン取込みの改善及び生育培地の組成に対する応答性は、in vitroでの細胞の化学応答性をin vivoでの腫瘍の応答の指標として使用するものである化学感受性アッセイにおいて細胞外マトリクスを特に価値のあるものとする。

細胞は薬物で処理する前に、37℃、5%炭酸ガスの湿ったインキュベーター内で24時間回復させる。薬物の4種の異なる量を含有する2×8形式の16穴の条片内で凍結乾燥されている癌化学療法剤は、生育培地で再構成されて細胞に加えられる。該4種の異なる濃度は、血漿中に達成することのできる薬物レベルに基づき、極度に抵抗性の細胞を検出するためのより高い1の薬物濃度と、感受性細胞を定量するためのより低い2の濃度とを伴う。現在入手できる薬物が、通常処方される癌化学療法剤を代表する。それらは、アドリアマイシン(Adriamycin(登録商標))、ブレオマイシン(Bleomycin(登録商標))、シスプラチノール[Cisplatinol(登録商標)](シスプラチンジアミンジクロライド)、エトポシド(Etoposide(登録商標))、5-フルオロウラシル(登録商標)、メルファラン(Melphalan(登録商標))、メソトレキセート(登録商標)、マイトマイシンC(登録商標)及び硫酸ビンブラスチンである。

細胞は、薬物効果が発現されるよう、選ばれた薬物と共に3日間インキュベートする。標本後処理の5日目にトリチウム標識チミジンをウェル当たり1μCi添加する。DNA合成の間のトリチウム

では、細胞外マトリクス上へ生育させたときは標本の89%が評価可能であったのに対し、プラスチック上で生育させたときは評価可能なものは0%であった。腎癌腫瘍は細胞外マトリクスの使用では95%の評価率であったが、プラスチックでは11%であった。Pavelic, K., M.A. Bulbul, H.K. Slocum, Z.P. Pavelic, Y.M. Rustum, M.J. Niedbala, and R.J. Bernacki, Growth of Human Urological Tumors on Extracellular Matrix as a Model for the In Vitro Cultivation of Primary Human Tumor Explants, Cancer Research, 46:3653-3662, 1986. これまで細胞培養でうまく維持されたことのなかった子宮内膜癌及び卵巣癌が、細胞外マトリクスの使用により100%培養可能であった。プラスチックと比較したとき細胞外マトリクス上で生育させた腫瘍細胞の成功率の上昇は、細胞がホルモン及び成長因子に対して生理学的に応答性となりin vivoの生育特性を探ることができることの証明となるものである。Crickard, Kent, Ulla Crickard, Mahmood Yoonessi, Human Ovarian Carcinoma Cells Maintained on Extracellular Matrix Versus Plastic, Cancer Research, 43:2762-2767, 1983. Pavelic, K., M.A. Bulbul, H.K. Slocum, Z.P. Pavelic, Y.M. Rustum, M.J. Niedbala, and R.J. Bernacki, Growth of Human Urological Tumors on Extracellular Matrix as a Model for the In Vitro Cultivation of Primary Human Tumor Explants, Cancer Research, 46:3653-3662, 1986. Vladavsky, I., G.M. Lui and D. Gospodarowicz, Morphological Appearance, Growth Behavior and Migratory Activity of Human Tumor Cells Maintained on Extracellular Matrix Versus Plastic, Cell 607-616, March 1980. Gospodarowicz, Denis.

標識チミジンの核酸への取込みは細胞生育の指標として使用される。腫瘍細胞が放射性核種に曝された後、細胞は収収され放射性核種はシンチレーションカウンターで測定される。薬物に曝されなかった陽性対照による核酸への放射性核種の取込み量は、薬物処理された腫瘍細胞による取込み量と比較され、1分当たりのカウント数(CPM)として表される。薬物によって影響されない耐性の腫瘍細胞の成長は、陽性対照ウェルの成長に比肩し、同様の放射活性を有するであろう。薬物に感受性の腫瘍細胞は、DNA合成の減少によって特徴付けられる生育の低下が起こり、陽性対照と比較した場合におけるCPMで表されるトリチウム標識チミジンの取込みの減少によって実証されるであろう。図1を参照のこと。

#### 試薬及び材料

1. モレキュラーシーブ乾燥剤と共にホイルパウチに包装された、牛角膜内皮細胞から誘導された細胞外マトリクスで被覆された96穴のマイクロウェル組織培養プレート
2. ポリビニルピロリドンで被覆したコロイド状シリカ懸濁液中での標本処理における勾配細胞分離のためのPercoll(登録商標)等張90%原液, 15 ml (Pharmacia Chemicals, Piscataway, NJ)
3. 生育培地: Roswell Park Memorial Institute 培地(RPMI)よりなる基本培地で再構成するための凍結乾燥したCyto-Gro(登録商標)289ホルモン及び成長因子増強剤、(Life Technologies, Grand Island, NY)+1%牛胎仔血清(Hyclone Laboratories, Logan, UT)、1%に再構成。
4. L-グルタミン(Sigma, St. Louis, Mo.) 2 mM、5 mM

、アスパラギン 0.5 mM, 5 ml

5. モレキュラーシーブ乾燥剤と共にオイルパウチ中に包装したマイクロウェル薬物条片。図2を参照のこと。各薬物条片は2×8方式の16穴を含む。再構成後の濃度( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )は以下の通りであり、各条片にラベルされている。試験すべき入手できる薬物は次のものを含む。

薬物名	販売元	供給濃度( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
アドリマイシン	Adria Laboratories	0.01, 0.1, 1.0, 10.0
ブレオマイシン	Bristol-Myers	0.01, 0.1, 1.0, 10.0
クサブラチノール	Bristol-Myers	0.01, 0.1, 1.0, 10.0
エトキシド	Bristol-Myers	0.05, 0.5, 5.0, 50.0
5-フルオロウラシル	Smith and Nephew	0.1, 1.0, 10.0, 100.0
メトトレキサート	Quad Pharmaceuticals	0.01, 0.1, 1.0, 10.0
ナイトマイシン-C	Bristol-Myers	0.01, 0.1, 1.0, 10.0
ビンブラスチン	Quad Pharmaceuticals	0.01, 0.1, 1.0, 10.0

6. フィコール (Ficoll: 登録商標)、100 ml (Organon Teknika Corporation, Durham, NC により製造された L S M)

#### 材料及び試薬の貯蔵

96穴マイクロウェル細胞外マトリクス組織培養プレート、生育培地、及び Percoll (登録商標) は2乃至8℃にて貯蔵した。薬物条片は開封せずに2乃至8℃にて保存した。フィコール及び溶解緩衝液は室温にて貯蔵した。グルタミン、ビルビン酸塩及びアルバラギンは-20℃以下で貯蔵した。試薬は使用前に室温に戻した。

#### 標本の収集及び輸送

##### 手術標本:

組織培養用培地で濯ぎ、培地を、より大きい組織片を避けながら、ポリスチレン管に移した。組織を1 ml の新鮮な組織培養用培地で繰り返し洗浄し、次いで洗液をポリスチレン管に加えた。細胞数をカウントした。もし十分な細胞数が得られたら(下記の「播種密度」の部を参照のこと)更なる処理は必要ない。もし得られなければ、サンプルを次のステップを用いて更に処理しなければならない。切り刻んだ標本を Collector (登録商標) 組織篩に移し、ガラスの乳棒で下方に押すことにより穏やかに組織に篩を通過させる。組織洗液を組織篩より回収された組織及び培地と合わせ、組織培養用培地で2回洗浄する。もし組織が過度に繊維性又はコラーゲン性で細胞がCollector(登録商標)組織篩のような機械的手段によっては分散できないなら、単一の遊離細胞にするためには消化酵素を使用しなければならない。典型的な酵素消化は、0.08% コラゲナーゼ及び0.002% DNase を含有する培地の使用を含み、穏やかに揺すりながら37℃にて1乃至18時間インキュベートする。細胞の生存性は最初の2時間は30分間隔でモニターしなければならない。生存性は、外側の死んだ細胞及び結合組織が消化されたときは増大しよう。大きい組織片を沈澱させ培地を懸濁細胞と共にポリスチレン円錐管に移す。酵素を除くため、細胞を組織培養用培地で2回洗浄し、生育培地で再懸濁する。

腫瘍細胞の生育性を、トリバンプルー及び血球計算盤を用いる分別カウントのような方法を用いて評価した。本アッセイにおける全生存性腫瘍細胞カウントは、1の薬物及び対照を試験するためには少なくとも $1-5 \times 10^5$  個なければならない。追加の各試験薬物ごとにより多くの細胞が必要である。

#### 液体標本の調製

腫水は、保存剤不含ヘパリンナトリウム (Invenex Laboratories Division of Lyphomed, Melrose Park, IL. 60160) を含有する容器に集め、最終的に10単位/ml 腫水とした。保存剤の存在は腫瘍細胞の増殖を阻害し、従ってこのアッセイにおいてサンプルを収集するのに用いてはならないことは注意すべきである。液体標本は処理することなく24乃至48時間は維持できる。最善の結果を得るためには、しかしながら、直ちにアッセイを開始する。

#### 固体標本の調製

腫瘍組織はいかなる時も無菌的に取扱われた。より良い結果を得るためには、腫瘍組織の生存できる領域は、脂肪及び正常組織を切り取ることによって分離し、壊死部分をさけなければならない。50 ml の円錐管にピペットした10 ml の輸送用培地(最少必須培地(MEM) 500 ml 中に10% FBS) を刻んだ腫瘍組織に加える。より良い結果を得るためには、手術標本は除去後30分以内に1 mm に切り刻む。アッセイは直ちに開始しなければならない。必要なら、切り刻んだ標本は手術後16時間は維持できるが、24時間を超えては維持できない。

#### 標本の調製と処理

##### 固形標本の処理

標本の全調製段階は無菌技術を用いたラミナフローのフード内において行った。標本は、無菌のピンセットを用いて輸送用培地より取り出し、5 ml の組織培養用培地(RPMI + 10% FBS) を含む100 mm のペトリ皿に置いた。標本を無菌の外科用メスで1 mm より小さいサイズの小片に切り刻んだ。組織片を10 ml の組

機械的及び酵素的細胞分散の後、標本はなおも正常細胞集団から腫瘍細胞を分離するための処理が必要である。磁性体ビーズ、Ficoll (登録商標) 及び/又はPercoll(登録商標) 勾配のような種々の細胞分離方法が利用できる。Ficoll(登録商標) 及びPercoll(登録商標) 勾配細胞分離法をここに記述する。もし細胞懸濁液が更なる処理を必要としていないなら、生育培地にて $1-5 \times 10^5$  個/ml の細胞懸濁液を調製する。細胞懸濁液の11 ml が、各96穴の播種プレートのための本アッセイに必要であった。

#### 液体標本の調製

全標本調製は、無菌技術を用いたラミナフローのフード内において行った。均一な細胞懸濁液を得るために、渦を巻かせることによって腫水を混合した。液体のみを遠心管に移し、 $400 \times g$  で7分間遠心した。上澄を取り除いた。

細胞ペレットを再懸濁し、生育培地で洗浄し、 $400 \times g$  で7分間遠心した。全ペレットを合わせ、生育培地(Cyto-Gro(登録商標) 289 補強剤 + 1% FBS + RPMI) に再懸濁した。

腫瘍細胞の生存性を、トリバンプルー及び血球計算盤を用いる分別カウントのような方法を用いて評価した。本アッセイにおける全生存性腫瘍細胞カウントは、1の薬物及び対照を試験するためには少なくとも $3 \times 10^5$  個なければならない。追加の各試験薬物ごとにより多くの細胞が必要であった。分別カウントの結果を用いて、細胞懸濁液を調製した。播種した各96穴のプレートのためには11 ml の細胞懸濁液を要した。

#### 腫瘍細胞の濃縮

Ficoll(登録商標) 細胞分離 もし標本が20%を超える赤血球

を含む場合にはこの段階が必要なることに注意。

Ficoll(登録商標) 標本処理は、無菌技術を用いたラミナフローのフード内にて行った。Ficoll(登録商標) 溶液の4 ml(比重1.077)を各円錐ポリスチレン管に加えた。標本を、10%の牛胎仔血清(FBS)を含有する組織培養用培地に懸濁して生存性腫瘍細胞を得た。標本懸濁液の10 mlをFicoll(登録商標)の4 mlの上に層状に加えた。2つの溶液が混合しないように注意しなければならない。懸濁液を1000×gで15分間遠心した。2つの溶液の境界面の細胞層を取り除き清浄な円錐ポリスチレン管に移した。細胞層を400×gで7分間遠心した。上澄を捨て、細胞ペレットを再懸濁し、細胞を組織培養用培地で3回洗浄した。細胞ペレットを組織培養用培地に再懸濁し、生存性腫瘍細胞をトリパンブルー及び血球計算盤等を用いる分別カウント法を用いてカウントした。分別カウントの結果を用いて、生育培地中に細胞 $3 \times 10^5$  個/mlを含有するように細胞懸濁液を調製した。播種する各96穴のウェルのために1 mlの細胞懸濁液を要した。

Percoll(登録商標) 勾配細胞分離 もし標本が高い%(30%より大)のリンパ球及び/又は高い量の細胞残滓を含むなら、この段階が必要である。

Percoll(登録商標) 分離は、無菌技術を用いたラミナフローのフード内にて行った。Percoll(登録商標) 溶液を90%から10%及び20%へと組織培養用培地を用いて希釈した。10%及び20%のPercoll(登録商標) は使用の直前に調製した。全標本のために必要な勾配数は次のようにして計算した。各勾配は $2 \times 10^7$  (全細胞)までを含む2乃至3 mlに調節することができる。10%乃至

であり、腫瘍細胞を播種したが無薬物であった。陽性対照ウェルは、癌化学療法剤で処理されなかった腫瘍細胞集団から得られたトリチウム標識チミジン取込みデータを提供した。

#### 播種密度

ウェル当たりの播種密度は、卵巣細胞や中皮腫のような大きい細胞のためにはウェル当たり $1 - 2 \times 10^4$  個の生存性腫瘍細胞とし小細胞肺のような小さい腫瘍細胞のためにはウェル当たり $3 - 5 \times 10^4$  個の生存性腫瘍細胞とした。結腸、前立腺、膀胱、乳房及び肺のような中間サイズの腫瘍細胞は、ウェル当たり $2 - 3 \times 10^4$  個の生存性腫瘍細胞を播種すべきである。

#### 播種密度例

5種の薬物を試験する場合には、総腫瘍細胞必要数は次の通りである。

$$\begin{aligned} \text{対照: } 8 \text{ ウェル} \times 1 - 5 \times 10^4 \text{ 個/ウェル/} 100 \mu\text{L} \\ = 0.8 - 4 \times 10^5 \text{ 個} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 5 \text{ 種の薬物条片: } 80 \text{ ウェル} \times 1 - 5 \times 10^4 \text{ 個/ウェル/} 100 \mu\text{L} \\ = 8 - 40 \times 10^5 \text{ 個} \end{aligned}$$

$$\text{総細胞必要数} = 8.8 - 44 \times 10^5 \text{ 個}$$

#### 細胞播種

細胞播種は、無菌技術を用いてラミナフローのフード内で行った。細胞外マトリクスマイクロタイタープレートの必要数は次の通りに計算した。1種の薬物を試験する場合には、24個のウェルに播種しなければならない。2種の薬物を試験する場合には、40個のウェルに播種しなければならない。陽性及び背景対照ウェルは、各標本と共に実施しなければならない。第1列に背景対照ウェルを配置し、

20%のPercoll 勾配をポリスチレン円錐遠心管に10%のPercoll(登録商標)の4 mlを加えることにより調製する。20%のPercoll(登録商標)の4 mlを10%のPercoll(登録商標)の下に、上側のPercoll(登録商標)層を攪乱しないよう注意しながら、層をなして置いた。Ficoll(登録商標)分離より得られた細胞をPercoll(登録商標)勾配の上に層をなして置いた。細胞懸濁液を50乃至60×gで10分間室温にて遠心した。

腫瘍細胞の大部分は遠心管の底にペレットとなるのが観察された。管の中の最も低い境界面は、しかしながら、いくらかの腫瘍細胞を含み、望むなら回収し検査することができる。より高い境界面は主として白血球等の正常細胞を含み捨ててよい。選択した細胞画分を組織培養用培地で3回洗浄しそして再懸濁した。腫瘍細胞をトリパンブルー及び血球計算盤等の分別カウント法を用いてカウントした。 $3 \times 10^5$  個の最少生存性腫瘍細胞カウントが1の薬物の試験に必要であった。追加の各薬物試験のためにはより多くの細胞を要した。分別カウントの結果を用いて、 $3 \times 10^5$  個/ml生育培地を含む懸濁液を調製した。播種した各96穴のプレートには細胞懸濁液1 mlが必要であった。

#### 陽性及び背景アッセイ対照

各標本につき、2列16個のウェルを背景及び陽性コントロールのために確保した。8個のウェルよりなる第1の列(1)は、ベータライン放射活性対照として働く無細胞無薬物の背景対照ウェルである。結果として、背景対照ウェルは洗浄段階が細胞外マトリクスウェルからトリチウム標識チミジンをいかにうまく取り除いたかを示した。陽性対照ウェルは、8個のウェルよりなる第2の列(2)

陽性対照ウェルを第2列に配置する(図1)。

細胞は、生育培地及び細胞を含む管を5、6回逆さにすることによって均一に分散させた。播種は、マルチ流路ピペッターとV字型貯蔵器(Costar(登録商標), Cambridge, Mass.)を用いて能率化した。配付操作は、細胞の均一な分配を保障するために、1分未満で完了することが重要である。陽性対照ウェル(第2列)には細胞を播種した。背景対照ウェル(第1列)には細胞を播種しなかった。 $1 - 5 \times 10^5$  個/mlの腫瘍細胞懸濁液を含む生育培地100 μLを、適切なウェルにピペットで加えた(全部でウェル当たり $1 - 5 \times 10^4$  個)。背景対照ウェルには細胞を播種しなかった。汚染の危険を減らすためにピペットのチップを各細胞の移替え毎に交換したことに注意せよ。マルチ流路ピペッターが播種の容易性を高める。細胞外マトリクスプレートを覆い、37℃、5%炭酸ガスにて、湿潤した環境下で24時間インキュベートした。

#### 薬物添加

ホイルに包装した薬物条片を、開封前室温にまで到達させた。ラミナフローのフード内で包装を開いた。微小薬物条片をホイルパウチから取り出し、ラベルを張った側の端を枠の下側に置いてプレート中に置き、その位置に固くスナップ止めた。図3を参照。薬物条片のラベルは個々の薬物に応じてコード付けされていた。CSとラベルされた対照条片は第1及び第2列に配置し、測定すべき薬物条片は続きの列に配置した。4濃度の薬物が $2 \times 8$ の薬物条片の各々に含まれている。下側の4個のウェルには最低の、そして上側の4個のウェルには最高の薬物濃度が含まれていた(以下の図を参照)。

プレート枠に全ての薬物及び対照条片を配置した後(図3参照)、125 $\mu$ lの生育培地を各ウェルに加えた。凍結乾燥された薬物の再構成に際しては、最低の薬物濃度のウェルから始め、最高の薬物濃度のウェルへと進む。各培地添加の前にはピペットチップを交換した。5種を超える薬物のアッセイに際しては、第2のプレート枠が必要である。第2のプレートのためには追加の対照条片は必要でない。

薬物を5分間溶解させそして反復吸引によって混合することにより、均質な懸濁液を保障した。再構成した薬物100 $\mu$ lを、細胞を含む適切なウェルにピペットして加えた。対照ウェルには播種しないことに注意。

1種より多くの薬物を試験する場合には、薬物条片相互間でピペットチップを交換しなければならない。容器を覆い、並べ、湿潤した環境下、37℃、5%炭酸ガスにて3日間インキュベートした。ただし、5-フルオロウラシル(登録商標)の試験に際してはより長いインキュベーション時間(96時間より長い)及び、従って、別の対照を用いなければならない。

#### トリチウム標識チミジンアッセイ

トリチウム標識チミジンを添加するまえに、容器のコンパートメントを、一貫した細胞層の生育、微生物の汚染のあるウェル及び障害性細胞を示すウェルに関して観察した。

アッセイを実施するに必要なトリチウム標識チミジンの量を計算した。ウェル当たりの最終濃度1.0 $\mu$ Ciを達成するために、各ウェルに25 $\mu$ lのトリチウム標識チミジンを加えた。これを達成するためには、生育培地で、トリチウム標識チミジン原液(6.7

Ci/mMol:1.0mCi/ml)の1:25希釈液を調製する。その結果、作業濃度は40 $\mu$ Ci/mlとなる。各ウェルに25 $\mu$ lを加えることにより、1 $\mu$ Ci/ウェルの濃度となる。96ウェルのプレートの全部をアッセイする場合には、96 $\times$ 25 $\mu$ l又は少なくとも2.4mlの1:25希釈液(すなわち、104 $\mu$ lのトリチウム標識チミジン原液及び2.5mlの生育培地)が必要である。

トリチウム標識チミジンの調製及び添加: 適切な量の生育培地及びトリチウム標識チミジンを管に加えた。各移替え毎にピペットチップを交換しながら、40 $\mu$ Ci/mlの希釈液25 $\mu$ lを各コンパートメントにピペットして加えた。プレートを覆い、湿潤した環境下、37℃、5%炭酸ガスにて10乃至16時間インキュベートした。

#### 細胞の収穫

ラインを約40mlの70%エタノールで洗浄することによって収穫機を調整した。濾紙を収穫機内に置き、パンチを下げた。濾紙は、収穫ヘッドに約25mlの水を通ずることによって予め湿らせた。インキュベーターより収穫すべきプレートを取出し、収穫ヘッドを最初の2段の中に入れ、ウェルの内容物を吸引した。収穫ヘッドを通じて水を配付し、およそ4個のウェル容積が通過するまで収穫ヘッドを洗浄した(1ml)。溶解緩衝液100 $\mu$ lをこれら24個のウェルに加え、緩衝液を2分間放置した。

収穫ヘッドを通して6乃至8ウェル分体積(1.25乃至2ml)の水でウェルを完全に洗浄した。

収穫ヘッドのラインを約40mlの70%エタノールで洗浄した

。収穫機の真空を逆転しそしてフィルターのストリップヘッド開いた。

24枚の個々のフィルターをシンチレーションバイアル内に置いた。

段階1から9までを、全ウェルが収穫されるまで反復した。

約2mlのシンチレーション液をバイアルに加え、キャップをしシンチレーションカウンター内で読み取った。

#### 評価しうるサンプルの定義

次の基準を満たす場合にのみアッセイが評価できるものと考えられる。すなわち、無処理対照の平均CPMが1000CPMより大であること、該平均CPMが背景CPMの4倍を超えること、背景CPMが200CPM未満であること、8個の対照ウェルの変動係数[(対照の標準偏差/対照の平均) $\times$ 100%]が50%未満であること。

#### データ解釈

背景対照の値は、培地を含むが細胞を含まない8個の背景対照ウェルからの放射活性カウントの平均であった。この値は、充分な収穫機洗浄が達成されたことを保証するベースライン放射活性対照として働いた。

陽性対照の値は、8個の陽性対照ウェルからの放射活性カウントの平均である。細胞はウェルに加えられたが化学療法剤は加えられておらず、従って、これらの細胞によるトリチウム標識チミジンの取込みは最大取込みを表す。陽性対照からの1分当たりのカウント(CPM)は100%と考えられた。

試験結果は、ここでは下記のように薬物処理ウェルからのCPM

を対照ウェルからのCPMで割ることにより計算される%対照として表した。すなわち、

(試験ウェルCPM-平均背景CPM)/(陽性対照ウェルCPM-平均背景CPM) $\times$ 100%=対照

血漿達成可能薬物濃度及び1/10血漿達成可能薬物濃度の範囲を示す。それは図の斜線部分により示される。図4乃至8を参照。データの解釈のためには、1/10血漿達成可能薬物濃度の平均値に対応する%対照値を用いる。1/10血漿達成可能濃度を用いたとき対照の生育の20%より小さいか又は等しい結果を与える薬物が感受性ありと考えられる。阻害が20%生育より低く、対照値の20%を超えるCPMを有する薬物は、耐性ありと考えられる。

20%対照(80%阻害)を陽性/陰性カットオフ値として用いる。類似のin vitro薬物応答アッセイにおいてそれが臨床応答に一層密接に相関することが見出されているからである。David H. Kern et al., Development of a Miniaturized, Improved Nucleic Acid Procedure Incorporating Assay for Chemosensitivity Testing of Human Solid Tumor, 45 Can. Res., 5436(1985), Tanigawa, Nobuhiko, David H. Kern, Yorinori Hikasa, and Donald L. Morton, Rapid Assay for Evaluating the Chemosensitivity of Human Tumors in Soft Agar Culture, Cancer Research, 42:2159-2164, 1982. 外科的乳癌標本から得られた化学応答性アッセイの結果を図4乃至8にプロットした。結果は、その標本がアドリアマイシン、ブレオマイシン及び5-フルオロウラシルに感受性であり(図4乃至6)、シスプラチン及びメルファランに耐性であること(図7及び8)を示している。

本発明は、特定の具体例との関連にお示したが、本発明の精神と範囲から逸脱することなく要求に適合させるために、諸段階の形態及び配列の種々の変更が可能であることは当業者に直ちに明らかであろう。

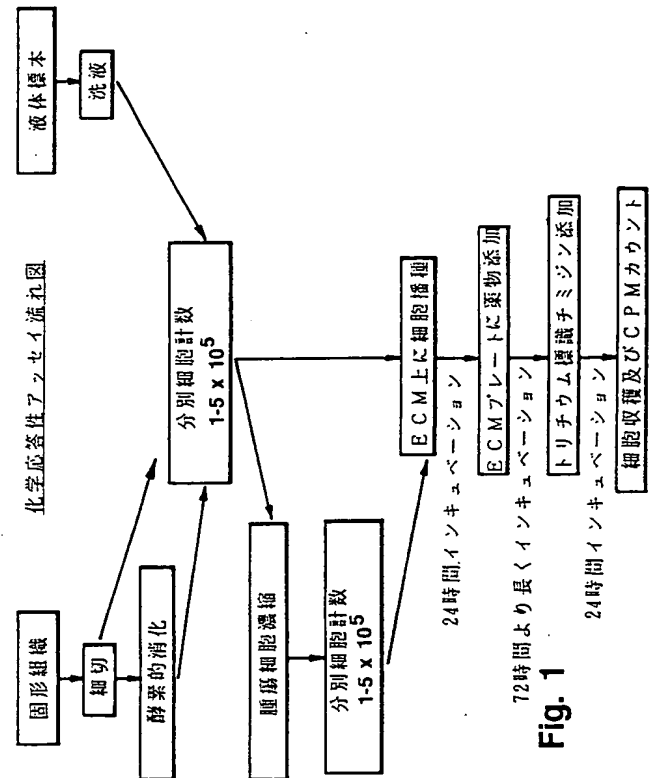


Fig. 2



Fig. 3

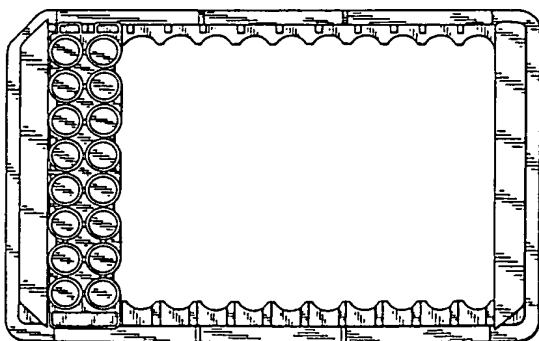


Fig. 4

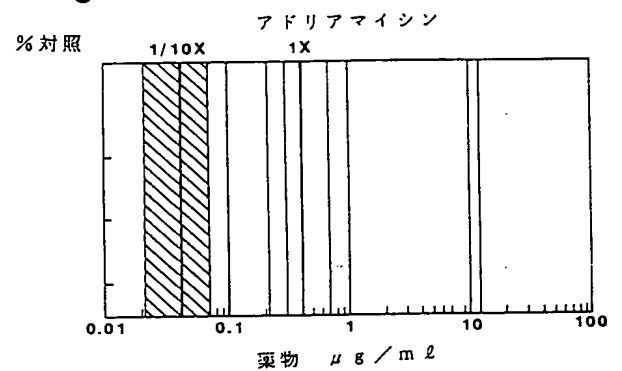


Fig. 5

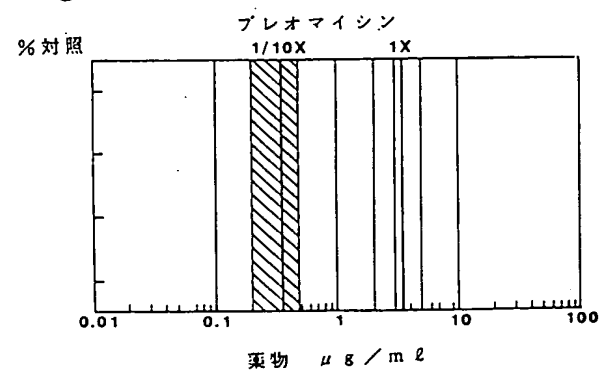


Fig. 6

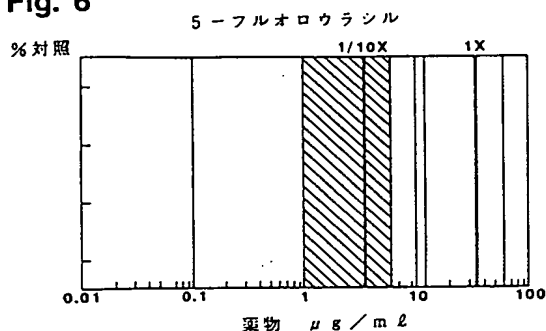


Fig. 7

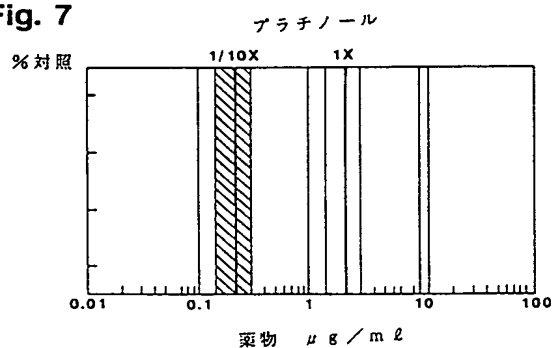
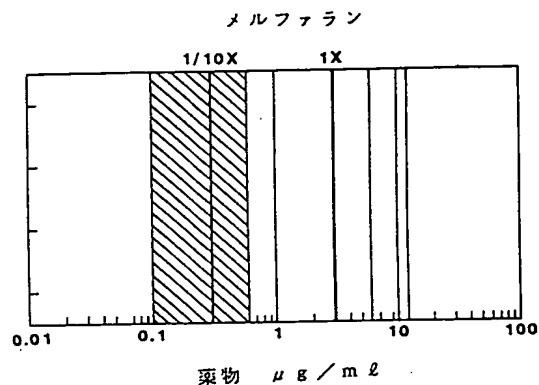


Fig. 8



## 要約書

予め決定された量の容易に配付することのできる形態の化学療法剤を用いて化学療法剤に対する生検腫瘍細胞の感受性をアッセイするための方法及び装置が開示され請求されている。

## 国際調査報告

International Search Report  
PCT/US91/03010

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC(5): C12H 3/00, 1/20; C12O 1/02; G01N 33/48  
U.S. CL.: 435/284, 301, 29; 436/64, 800, 813

2. FIELDS SEARCHED  
Minimum Documentation Searched:  
Classification System: U.S. 435/284, 301, 29; 436/64, 800, 813  
Classification System: Minimum Documentation Searched:  
U.S. 435/284, 301, 29; 436/64, 800, 813

Documentation Searched other than Minimum Documentation:  
to the extent that such Documents are included in the Fields Searched

3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of Document, if available, and, where appropriate, of the relevant sections of	Relevant to Claim No. 1?
Y	US. A. 4,816,395 (BARCOCK ET AL.) 28 March 1989, see entire document.	12-34
X	US. A. 4,657,867 (GUEL ET AL.) 14 April 1987, see entire document.	1-3 4-11
X	CANCER RESEARCH, Vol. 45, issued November 1985, KERN, D.H. ET AL., "Development of a Miniaturized Improved Nucleic Acid Precursor Incorporation Assay for Chemosensitivity Testing of Human Solid Tumors", pages 5436-5441, see entire document.	1-3 4-34
X	GYNECOLOGIC ONCOLOGY, Volume 31, issued 02 May 1988, SEVIN, B.U. ET AL., "Application of an ATP-Bioluminescence Assay in Human Tumor Chemosensitivity Testing", pages 191-204, see entire document.	1-3 4-34
Y	CANCER RESEARCH, Volume 46, issued July 1986, PAVELIC K. ET AL., "Growth of Human Urological Tumors on Extracellular Matrix as a Model for the in vitro Cultivation of Primary Human Tumor Explants", pages 3653-3662, see entire document.	1-34

4. CERTIFICATION

26 July 1991

ISA/US

27 AUG 1991

Thomas Dacey (vsh)

第1頁の続き

②発明者 コックス, トム

②発明者 ルイス, ブレッド

アメリカ合衆国98053、ワシントン、レッドモンド、トウーハンド  
レッドサーテイスアベニューノースイースト 7504

アメリカ合衆国92334、カリフォルニア、フォンタナ、ヘムロック  
8476